



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



Veröffentlichungsnummer: **0 431 327 A1**

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

Anmeldenummer: **90121189.6**

Int. Cl.⁵: **A61K 39/145, A61K 39/385**

Anmeldetag: **06.11.90**

Priorität: **10.11.89 DE 3937412**

Veröffentlichungstag der Anmeldung:
12.06.91 Patentblatt 91/24

Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

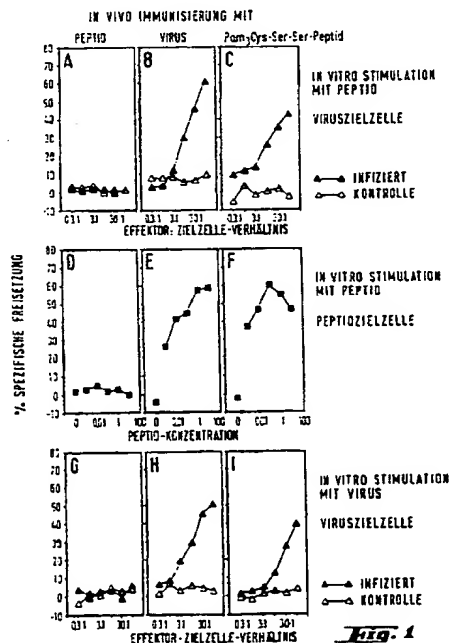
Anmelder: **HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT**
Postfach 80 03 20
W-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

Erfinder: **Jung, Günther**

Ob der Grafenhalde 5
W-7400 Tübingen(DE)
Erfinder: **Rammensee, Hans-Georg**
Sommerhalde 3
W-7400 Tübingen(DE)
Erfinder: **Deres, Karl**
Gartenstrasse 200
W-7400 Tübingen(DE)
Erfinder: **Wiesmüller, Karl-Heinz**
Rappenbergalder 33
W-7400 Tübingen(DE)

Synthetische Vakzine zur spezifischen Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten.

Eine synthetische Vakzine zur spezifischen Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten, besteht aus einem Konjugat aus mindestens einer Membranankerverbindung und einem mindestens ein Killer-T-Zellepitop enthaltenden Protein eines Virus, eines Bakteriums, eines Parasiten oder eines Tumorantigens oder mindestens einer mindestens ein Killer-T-Zellepitop enthaltenden Partialsequenz eines Virus-, Bakterium- oder Parasiten-Proteins oder eines Tumorantigens.



SYNTHETISCHE VAKZINE ZUR SPEZIFISCHEN INDUKTION ZYTOTOXISCHER T-LYMPHOZYTEN

Die vorliegende Erfindung betrifft eine synthetische Vakzine zur spezifischen Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten.

Zytotoxische T-Lymphozyten (Killer-T-Zellen) stellen einen wesentlichen Teil der Immunantwort von Warmblütern gegen intrazelluläre Infektionen dar. Zytotoxische T-Lymphozyten werden normalerweise nur
5 mittels einer in-vivo-Impfung mit infektiösen Erregern induziert (J. Bastin et al., J. Exp. Med., Vol 165, June 1987). Wegen der damit verbundenen Risiken würde ein synthetischer Impfstoff für die spezifische Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten eine erhebliche Verbesserung darstellen. Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß durch die Verwendung bestimmter Membranankerwirkstoffkonjugate
10 enthaltend Killer-T-Zellepitope die spezifische in-vivo-Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten möglich ist.

Es ist zwar bereits bekannt, daß Membranankerwirkstoffkonjugate zur Erzeugung neutralisierender Antikörper geeignet sind (vgl. Angew. Chem. 97 (1985), Nr. 10, S. 883 ff.); über eine synthetische Vakzine enthaltend Membranankerwirkstoffkonjugate zur spezifischen Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten wurde jedoch bisher nicht berichtet.

15 Erfindungsgegenstand ist demzufolge eine synthetische Vakzine zur Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten, die dadurch gekennzeichnet ist, das sie aus einem Konjugat aus mindestens einer Membranankerverbindung und einem mindestens ein Killer-T-Zellepitop enthaltenden Protein eines Virus, eines Bakteriums, eines Parasiten oder eines Tumorantigens oder mindestens einer Partialsequenz enthaltend
20 mindestens ein Killer-T-Zellepitop eines Virus-, Bakterium- oder Parasiten-Proteins oder eines Tumorantigens besteht.

Die genannte Membranankerverbindung ist vorzugsweise ein bakterielles Lipoprotein. Besonders bevorzugt ist als Membranankerverbindung eine Verbindung der nachstehenden Formeln

25

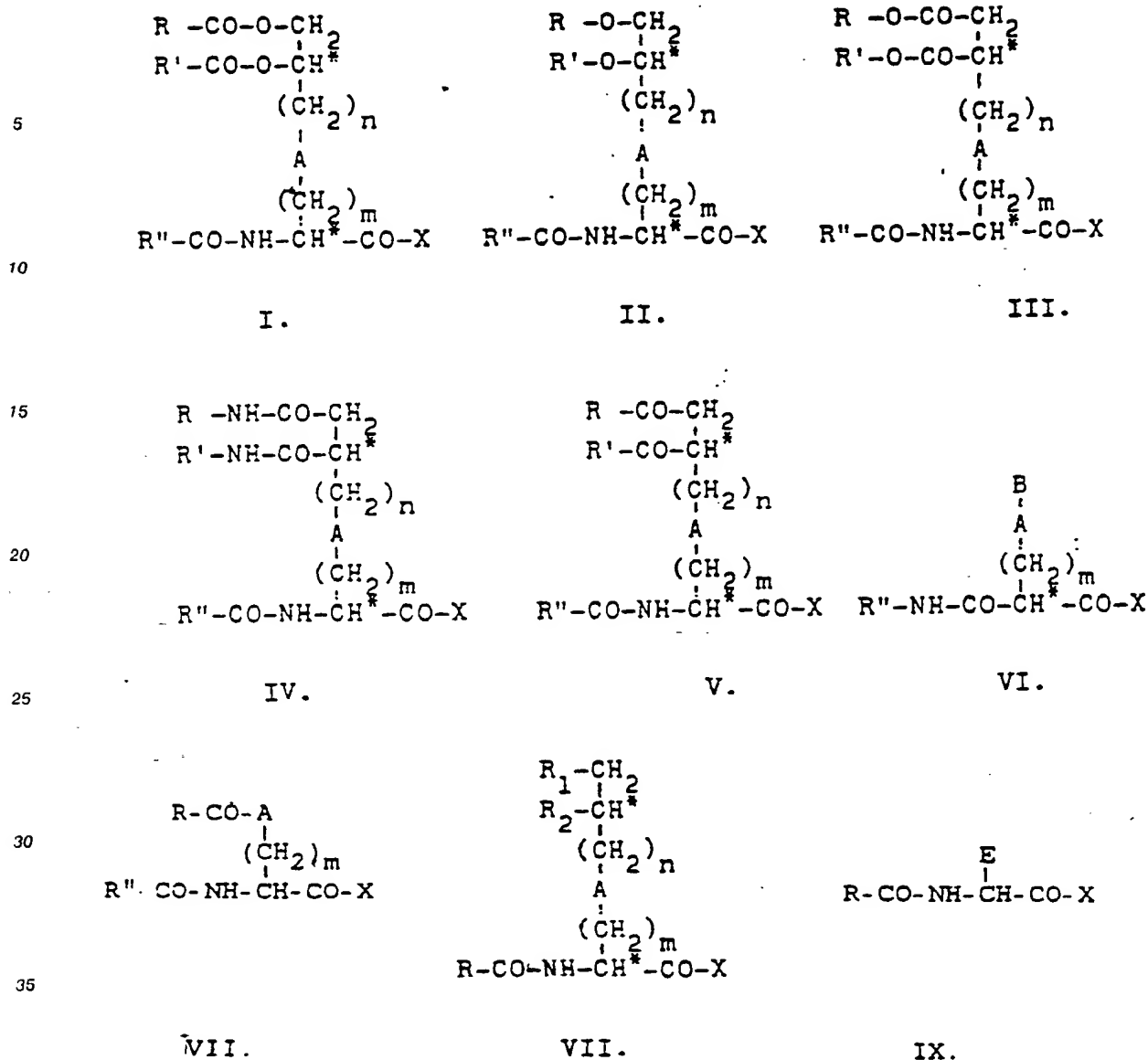
30

35

40

45

50



in denen A Schwefel, Sauerstoff, Disulfid (-S-S-), Methylen (-CH₂-) oder -NH- sein kann;

n = 0 bis 5, m = 1 oder 2;

C* ein asymmetrisches Kohlenstoffatom mit R- oder S-Konfiguration ist,

45 R, R' und R'' gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine Alkyl-, Alkenyl- oder Alkynylgruppe mit 7 bis 25 Kohlenstoffatomen sind, welche mit Hydroxy-, Amino-, Oxo-, Acyl-, Alkyl- oder Cycloalkylgruppen substituiert sein kann, E in Formel IX Wasserstoff oder eine beliebige Seitenkette einer natürlichen oder

50 artifiziellen α-Aminosäure sein kann, B in Formel VI die Bedeutung jedes der in den Formeln I - V aufgeführten -(CH₂)_n-(substituiertes Alkyl)-Reste haben kann und R₁ und R₂ gleich oder verschieden sind und dieselben Bedeutungen wie R, R' und R'' haben, aber auch -OR, -O-COR, -COOR, -NHCOR oder -CONHR sein können, wobei X eine Kette von bis zu 10 Aminosäuren ist, an die das Protein oder die

Partialsequenz des Virus-, Bakterium- oder Parasiten-Proteins oder eines Tumorantigens gebunden ist, oder das Protein oder die Partialsequenz selbst ist.

Von diesen sind als Beispiele besonders hervorzuheben: In bakteriellem Lipoprotein vorkommende N-Termini, wie z.B.: Y-Ser-Ser-Ser-Asn, Y-Ile-Leu-Leu-Ala, Y-Ala-Asn-Asn-Gln, Y-Asn-Ser-Asn-Ser, Y-Gly-Ala-Met-Ser, Y-Gln-Ala-Asn-Tyr, Y-Gln-Val-Asn-Asn, Y-Asp-Asn-Ser-Ser, wobei Y einer der unter Formel I bis VII

55 aufgeführten Reste sein kann. Diese Lipopentapeptide können auch in verkürzter Form (Lipodi-, Lipotri- oder Lipotetrapeptide) als Membranankerverbindung eingesetzt werden. Ganz besonders bevorzugt ist N-

Palmitoyl-S-[2,3(bispalmitoyloxy)propyl]-cysteinyl-seryl-serin (Pam₃Cys-Ser-Ser), N-Palmitoyl-S-[2,3-(bispalmitoyloxy)propyl]-cysteinyl-seryl-glycin und N-Palmitoyl-S-[2,3-(bispalmitoyloxy)propyl]-cysteinyl-alanyl-D-isoglutamin.

Weiterhin besonders bevorzugt sind die Verbindungen der Formeln I und III, insbesondere Verbindungen der Formel I.

Der Substituent A ist vorzugsweise Schwefel oder Methylen, besonders bevorzugt Schwefel.

Die Substituenten R, R' und R'' sind vorzugsweise Alkylreste mit 14 bis 18 C-Atomen; besonders bevorzugt sind Alkylreste mit 16 C-Atomen.

Der Substituent X wird vorzugsweise gebildet aus 1 bis 2 polaren Aminosäureresten, besonders bevorzugt ist der Serin-Rest.

Für die erfindungsgemäße Vakzine eignen sich zur Kopplung an die Membranankerverbindung unterschiedliche Proteine oder Protein-Partialsequenzen von intrazellulär auftretenden Krankheitserregern, Viren-, Bakterien- oder Parasiten-Proteinen oder von Tumor-Antigenen, die von Killer-T-Zellen erkannt werden.

Solche Proteine oder Partialsequenzen (auch als Killer-T-Zell-Epitope bezeichnet) zeichnen sich dadurch aus, daß sie von zytotoxischen T-Lymphozyten zusammen mit MHC-Molekülen (major histocompatibility complex) erkannt werden.

Die erfindungsgemäße Vakzine eignet sich zur Immunisierung gegen alle Erreger, die Killer-T-Zell-Epitope aufweisen, wie z. B. gegen Adenoviren, HIV, Influenza-Viren, LCMV, MCMV, Hepatitis-Viren, HTLV, FELV, Treponema pallidum, Gonokokkus, Bordetella pertussis, Plasmodien, Listerien, Mycobakterien oder Leishmanien. Bisher bereits bekannte Killer-T-Zell-Epitope sind die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Partialsequenzen, von denen das Influenza-Nukleoprotein P₃CSS-NP 147-158 (R⁻) und die HIV-Epitope eine Sonderstellung einnehmen.

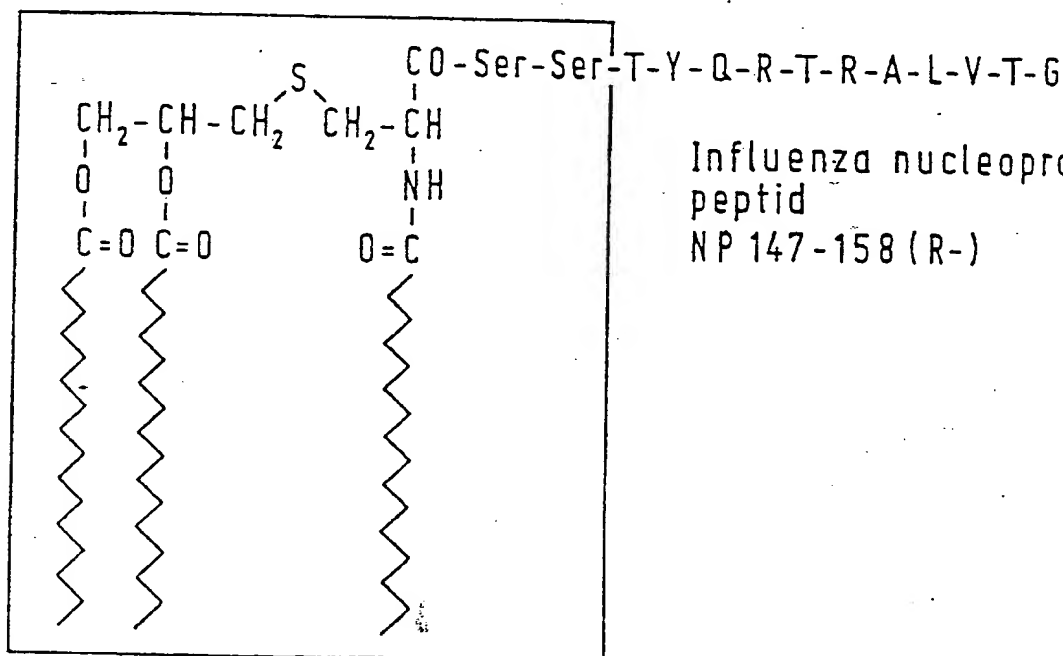
25

30

35

40

45



Influenza nucleoprotein
peptid
NP 147-158 (R-)

Lipotripeptid Pam₃Cys-Ser-Ser

50

55

	Organismus	Protein	von - bis	Restr.	Sequenz
	Adenovirus Ad5E1A			Db	PSNTPPEI
5	HIV	env (gp 120)	381-392	HLA A2	(K)NCGGEFFYCNS
	HIV	env (gp 120)	308-322	Dd	RIQRGRPGRAFVTIGK
	HIV	env (gp 120)	410-429	DR4	GSDTITLPCRIKQFINMWQE
	HIV	gag (p17)	418-443	A2	KEGHQMKDCTERQANF
	HIV	gag (p17)	446-460	A2	GNFLQSRPEPTAPPA
10	HIV	gag (p24)	193-203	A2	GHQAAMEMLKE
	HIV	gag (p24)	219-233	A2	HAGPLAPGQMREPRG
	HIV	gag (p24)	265-280	B27	KRWIILGLNKIVRMYC
	Influenza	Nucleoprotein	82-94	HLA A2	MVVKLGEFYNQMM
	Influenza	Matrix	57-68	HLA A2	KGILGFVFTLV
15	Influenza	Nucleoprotein	335-349	B37 B44 A2 Aw69	SAAFEDLRVLSFIRG
	Influenza	Hemagglutinin H3	58-73	H-2 Ad	ILDGIDCTLIDALLGD
	Influenza	Hemagglutinin H3	58-73	H-2 Ad	ILDGIDCTLIDALLGD
	Influenza	Hemagglutinin	181-204	H-2K;H-2K	-
20			103-123		
	Influenza	Nucleoprotein	365-379		SDYEGRLIQNSLTI
	Influenza	Nucleoprotein	335-349	H-2b	IASNENMETMESSTL
	Influenza	Nucleoprotein	384-393	HLA B27	RYWAIRTRSG
	Influenza	Nucleoprotein	147-158	Kd	TYQRTRALV (R) TG
25	A/NT/60/68	Nucleoprotein	118-126	Ld Lq	RPQASGVYM
	LCMV	-	278-286	H-2b	VENPGGYCL
	-	-	277-293	H-2b	GVENPGGYCLTKWMILA
	-	-	168-176	-	YPHFMPNTL
30	MCMV	-	161-179	Ld	GRLMYDMYPHFMPNTNLGPS
	P815	Tumor antigen P91A	12-24	Ld	ISTQNHRAIDLVA
	Plasmodium falciparum, berghei	Circumsporozoite prot.	368-390	H-2K	KPKDEL DYENDIEKKICKMEKCSC
35		Circumsporozoite prot.	249-260	Kd	NDDSYIPSAEKI
	yoelii	-	276-288	Kd	NEDSYVPSAEQI
	Hepatitis B	HBsAg	21-28	-	PLGFFPDH

40

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vakzine ist es darüber hinaus möglich, verschiedene Membrananker-
verbindungen, gekoppelt an verschiedene Partialsequenzen zu mischen, um eine auf ein bestimmtes Ziel
optimal abgestimmte Vakzine zu erhalten. Weiterhin kann eine entsprechende Mischung zusätzlich Mem-
branankerwirkstoffkonjugate enthalten, die die humorale Immunantwort stimulieren und zusätzlich zur
45 Produktion von neutralisierenden Antikörpern führen (Vaccine 7, 29 - 33 (1989), Angew. Chem., Int. Ed. 24,
872 - 873 (1989)). Darüber hinaus ist es auch möglich, verschiedene Partialsequenzen kovalent zu
verknüpfen und mit einer Membranankerverbindung zu verbinden.

Erfindungsgegenstand ist weiterhin ein Verfahren zur Herstellung einer synthetischen Vakzine, das
dadurch gekennzeichnet ist, daß Proteine oder Partialsequenzen von Erregern durch eine Konjugationsreak-
50 tion an die Membranankerverbindung gebunden wird. Die Konjugationsreaktion kann z. B. eine Kondensa-
tion, Addition, Substitution, Oxidation oder Disulfidbildung sein. Bevorzugte Konjugationsmethoden sind in
den Beispielen wiedergegeben. Weitere Konjugationsmethoden sind in der bereits zitierten Deutschen
Offenlegungsschrift 35 46 150 beschrieben.

Die Herstellung der Membranankerverbindungen ist ebenfalls in der zuletzt genannten deutschen
55 Offenlegungsschrift ausführlich beschrieben.

Die gegebenenfalls nötige Trennung der Diastereomeren kann nach unterschiedlichen Methoden, wie z.
B. in Hoppe-Seyler's Z. Physiolog. Chem. 364 (1983) 593 beschrieben erfolgen.

Der Aufbau der für die Membranankerwirkstoffkonjugate einzusetzenden Partialsequenzen kann auf

unterschiedliche, literaturbekannte Weise erfolgen, vgl. z. B. Wunsch et al. in Houben-Weyl, Bd. 15/1.2, Stuttgart, Thieme-Verlag oder Wunsch in Angew. Chem. 83 (1971), E. Gross und J. Meienhofer (Herausgeb.), The Peptides, Vol. 1 (1979), 2 (1979), 3 (1981) und 5 (1983) Academic Press, New York 7713 oder die Deutsche Offenlegungsschrift 35 46 150. In Beispiel 1 wird ein bevorzugtes Verfahren zur Herstellung einer Partialsequenz und eines Konjugats näher erläutert.

Weiterhin gehören zum Erfindungsgegenstand pharmazeutische oder veterinärmedizinische Zubereitungen, die einen Gehalt an Konjugat aus mindestens einer Membranankerverbindung und mindestens einer Partialsequenz eines der genannten Proteine oder Organismen aufweisen. Normalerweise werden zusätzlich neben einem Lösungsmittel keine zusätzlichen Hilfs- und Trägerstoffe oder Adjuvantien für die erfindungsgemäßen Zubereitungen benötigt. In manchen Fällen kann es aber sinnvoll sein, derartige Hilfs- und/oder Trägerstoffe sowie gegebenenfalls Adjuvantien den erfindungsgemäßen Zubereitungen zuzusetzen (Anton Mayr, Gerhard Eibnen, Barbara Mayr-Bibrack, Handbuch der Schutzimpfungen in der Tiermedizin, 1984, Verlag Paul Parey, Berlin-Hamburg).

Die Menge an Vakzine, die für eine sichere Immunisierung eines Warmblüters notwendig ist, hängt ab von der Art des Warmblüters, von der bzw. den Membranankerverbindungen und dem Protein oder der bzw. den Partialsequenzen des Organismus, gegen den immunisiert werden soll und ist im Einzelfall empirisch zu ermitteln.

Durch die nachfolgenden Beispiele soll die Erfindung näher erläutert werden.

20 **Synthese**

Beispiel 1

Synthese von N-Palmitoyl-S-[2,3-(bispalmitoyloxy)-propyl]cysteinyl-seryl-seryl-NP 147-158

Die Influenza A-Virus-Nukleoprotein-Peptidsequenz wurde durch Festphasenpeptidsynthese synthetisiert. Es wurden Fmoc-Aminosäuren benutzt. Folgende Seitenkettenschutzgruppen kamen zur Anwendung: Thr(tBu), Tyr(tBu), Arg(Pmc). Es wurde 1 g para-Benzoyloxybenzylalkohol-Harz, beladen mit 0,5 mmol Fmoc-Gly eingesetzt und die Peptidsequenz nach folgenden Synthesesyklen aufgebaut. N-Aktivierung mit 50 % Piperidin in DMF (1 x 10 min). Kupplung der folgenden Aminosäure für 30 min mit BOP/HOBT [Benzotriazol-1-yl-oxy-tris(dimethyl amino)-phosphoniumhexafluorophosphat/1-Hydroxybenzo-triazol] und Diisopropylethylamin in DMF. Es wurden jeweils Doppelkupplungen mit 3-fachem Überschuß an Fmoc-Aminosäure und 4,5-fachem Überschuß an Diisopropylethylamin (jeweils bezogen auf freie Aminogruppen am Harz) durchgeführt. Nach jeder Doppelkupplung wurde das Peptidharz je dreimal mit N-Methylpyrrolidon, Dichlormethan und N-Methylpyrrolidon gewaschen.

Nach der Synthese der harzgebundenen Influenza A-Virus-Nukleoprotein-Sequenz wurde ein Teil des Peptids durch Trifluoressigsäurespaltung gewonnen und auf Reinheit geprüft mittels HPLC, MS, Aminosäureanalyse, Analyse auf chiraler Phase sowie Sequenzanalyse. Die HPLC-Prüfung ergab eine Reinheit von über 90 %. Nach Kupplung von zwei Serinresten [Fmoc-Ser(tBu)] an das harzgebundene Peptid, erfolgte die Kupplung des Tripalmitoyl-S-glycerincysteins nach der DIC/HOBT-Methode. Nach vier Stunden wurde ein Äquivalent N-Methylmorpholin hinzugefügt und nach einer weiteren Stunde wurde das Lipopeptid-Harz gewaschen. Das Lipopeptid wurde von 100 mg Harz mittels 2 ml Trifluoressigsäure (mit 100 µl Thioanisol und 100 µg Thiokresol) innerhalb von einer Stunde getrennt. Um die Arg(Pmc)-Schutzgruppen vollständig zu entfernen, wurde zusätzlich 30 min bei 50 °C mit Trifluoressigsäure nachbehandelt. Das Filtrat wurde eingedampft, der Rückstand mit Essigsäure aufgenommen und in kalten Ether gegeben. Das ausgefallene Lipopeptid wurde 3 x mit Ether gewaschen und aus tert.-Butanol/Wasser im Verhältnis 3 : 1 lyophilisiert.

Beispiel 2

50 Synthese von N-Palmitoyl-S-[2,3-(bispalmitoyloxy)-propyl]cysteinyl-seryl-seryl-NP (365-380)

Die Synthese erfolgte analog Beispiel 1. Es wurden Fmoc-Aminosäuren mit folgenden Seitenkettenschutzgruppen benutzt: Ser(tBu), Glu(OtBu), Thr(tBu). Asn wurde ohne Seitenkettenschutzgruppe mittels Diisopropylcarbodiimid/HOBT gekuppelt. Als Ausgangsharz wurde Fmoc-Glu(OtBu)-p-Benzoyloxybenzylalkohol-Polystyrol, quervernetzt mit 1 % Divinylbenzol, eingesetzt. Die Beladung an Fmoc-Glu(OtBu) betrug 0,45 mmol/g. Die Abspaltung des Peptids und Pam₃Cys-Ser-Ser-Peptids von je 100 mg Harz erfolgte mit 2 ml Trifluoressigsäure unter Zusatz von 0,1 ml Thioanisol und 100 µg Thiokresol innerhalb von 90 min. Die Sequenz wurde durch Sequenzanalyse des freien Peptids bestätigt; durch HPLC-

Prüfung wurde ein einheitlicher Peak mit über 90 % ermittelt. Aminosäurenanalyse und Prüfung auf Enantiomerenreinheit an chiraler Phase ergaben die erwarteten Werte.

Wirksamkeitstests

5

A)

Unter SPF-Bedingungen gezüchtete, 3 Monate alte BALB/c-Inzuchtmäuse wurden intravenös mit 100 µg Pam₃Cys-Ser-Ser- [NP 147-158] immunisiert. (100 µg Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 147-158], aufgenommen in
 10 300 µl PBS, 1 min beschallt). Nach 28 Tagen wurden die Mäuse mit 0,2 bzw. 0,4 haemagglutinierenden Einheiten Influenza-Virus A/PR/8 intranasal infiziert. Analog wurden zur Kontrolle Mäuse infiziert, denen 300 µl PBS intravenös appliziert wurde. Der Verlauf der Infektion wurde anhand von täglichen Gewichtskontrollen und der Überlebensrate kontrolliert. 11 von 12 Kontrolltieren, die mit 0,4 haemagglutinierenden Einheiten infiziert wurden, starben nach 11 Tagen an der Virusinfektion, während von den immunisierten Tieren nur 4
 15 von 12 starben.

Eine weitere Kontrollgruppe und eine mit Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 147-158] immunisierte Gruppe wurden mit 0,2 haemagglutinierenden Einheiten Influenza-Virus infiziert. Nach 18 Tagen lebten noch 40 % der Kontrolltiere (4 von 10 Tieren), während 75 % der immunisierten Tiere lebten. Am Tag 18 betrug die Gewichts-
 20 differenz zwischen immunisierten Tieren und Kontrolltieren 4 g. Die überlebenden Tiere der Kontrollgruppe verloren weiter an Gewicht, während sich die immunisierten Tiere langsam von der Infektion erholten.

B)

25 Zytotoxische T-Zell-Aktivität von Milzzellen aus BALB/c-Mäusen nach Immunisierung mit freiem Peptid, Virus oder Pam₃Cys-Ser-Ser-Peptid (Fig. 1)

BALB/c-Mäuse erhielten durch intravenöse Applikation in 300 µl PBS

- a) 8×10^7 mit 1,6 µM Nukleoproteinpeptid 147-158 (R-) vorinkubierte, syngene Milzzellen; (A, D, G),
- b) 8×10^7 mit 160 µM Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 147-158 (R-)]-Lipopeptid vorinkubierte, syngene Milzzellen;
 30 (C,F),
- c) 50 haemagglutinierende Einheiten von Influenza A-Virus PR/8/34; (B,E,H),
- d) 100 µg Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 147-158 (R-)]; (I).

Nach 6 Tagen wurden den immunisierten bzw. infizierten Tieren die Milzen entnommen und die Milzzellen 5 Tage lang mit Peptid (A bis F) oder mit Virus PR8 infizierten, syngenen Stimulatorzellen (G,H,I)
 35 restimuliert. Dazu wurden je $2,5 \times 10^7$ -Zellen kultiviert in 10 ml α-MEM-Medium (Hersteller: Gibco), angereichert mit 10 % fötalem Kälberserum, 2-Mercaptoethanol, Glutamin und Antibiotika unter Zusatz von entweder 80 nM NP 147-158(R-)-Peptid (A,F) oder von 5×10^6 -Virus PR8-infizierten, mit 20 Gy bestrahlten syngenen Milzzellen (G,H,I). Die Infektion von Stimulator und Zielzellen wurde wie beschrieben durchgeführt (Eur. J. Immunol. 7, 630 - 635 (1977)).

40 Die Aktivität der zytotoxischen T-Zellen wurde durch einen ⁵¹Cr-Release-Standardtest (Eur. J. Immunol. 137, 2.676 -2.681 (1986)) ermittelt. Schaubilder A, B, C und G, H, I zeigen die CTL-Aktivität auf unbehandelte (Δ) oder PR8 infizierte (▲) P815 (MHC:H-2^d)-Zielzellen.

Schaubilder D, E und F zeigen CTL-Aktivität auf P815-Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen von freiem Peptid 30 min bei 37 °C vorbehandelt wurden. Hier wurde ein Verhältnis von Effektor zu Zielzelle
 45 30 : 1 eingesetzt.

C)

Aktivität zytotoxischer T-Zellen nach Immunisierung von Mäusen mit Pam₃Cys- Ser-Ser-[NP 147-158]
 50 oder Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 365 - 380] (Fig. 2)

BALB/c-Mäuse (Schaubilder A,B) oder (B6 x DBA/2)-F1-Mäuse (C,D) wurden mit Influenza A-Virus (A,C) bzw. mit 100 µg Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 147-158] (Bild B) bzw. mit 100 µg Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 365-380] (Bild D) immunisiert. Nach 6 Tagen wurden die Milzen entnommen und die Milzzellen, wie unter B) beschrieben, in Gegenwart von 0,8 µM NP 147-158 Peptid (A,B) bzw. 0,8 µM NP 365-380 Peptid (C,D)
 55 stimuliert. Die Aktivität der zytotoxischen T-Zellen wurde anschließend auf unbehandelte P815-Zielzellen (Δ), auf PR8 infizierte P815-Zielzellen (▲) und auf 90 min bei 37 °C mit NP 147-158-Peptid vorinkubierte P815-Zielzellen (■) geprüft; ebenso auf unbehandelte EL-4-(MHC H-2^d)-Zellen (○), auf PR8 infizierte EL-4-Zielzellen (*), und auf 90 min bei 37 °C mit NP 365-380-Peptid vorinkubierte EL-4-Zellen (◆).

D)

Prüfung auf MHC Klasse I-Restriktion und auf Spezifität der Immunisierung mit Lipopeptid (Fig. 3)

- BALB/c-Mäuse (Bilder A,B,C) oder (86 x DBA/2)-F1-Mäuse (Bilder D-I) erhielten i.v. in 300 µl PBS 100 µg Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 147-158(R-)] (Bilder A,E,H) bzw. 50 µg Ser-Ser-[NP 147-158(R-)] (Bild B) bzw. 50 µg [NP 147-158(R-)] (Bild C) bzw. 50 haemagglutinierenden Einheiten Influenza PR8-Virus (Bilder D,G) bzw. 100 µg Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 365-380] (Bilder F,I).

Sechs Tage nach der Injektion wurden die Milzzellen, wie in Beispiel 2 beschrieben, kultiviert unter Zusatz von Nukleoprotein 147-158(R)-Peptid (Bilder A - F), oder Nukleoprotein 365-380-Peptid (Bilder G -

- 10 I). Die Aktivität der erhaltenen cytotoxischen T-Zellen wurde bestimmt gegen

- unbehandelte P815-Zielzellen (Δ)
- 90 min bei 37° C mit NP 147-158(R-) vorinkubierte P815-Zielzellen (■)
- 90 min bei 37° C mit NP 365-380 vorinkubierte P815-Zielzellen (□)
- unbehandelte EL-4-Zielzellen (○)
- 15 - 90 min bei 37° C mit NP 147-158(R-) vorinkubierte EL-4-Zielzellen (◇)
- 90 min bei 37° C mit NP 365-380 vorinkubierte EL-4-Zielzellen (◆).

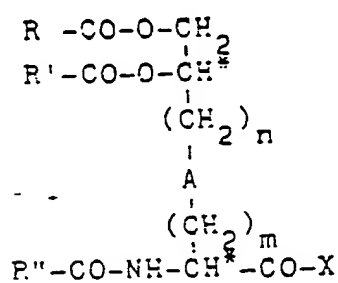
Ansprüche

- 20 1. Synthetische Vakzine zur spezifischen Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus einem Konjugat aus mindestens einer Membranankerverbindung und einem mindestens ein Killer-T-Zellepitop enthaltenden Protein eines Virus, eines Bakteriums, eines Parasiten oder eines Tumorantigens oder mindestens einer mindestens ein Killer-T-Zellepitop enthaltenden Partialsequenz eines Virus-, Bakterium- oder Parasiten-Proteins oder eines Tumorantigens besteht.
- 25 2. Synthetische Vakzine gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranankerverbindung ein bakterielles Membran-Lipoprotein ist.
3. Synthetische Vakzine gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranankerverbindung eine der nachstehenden Formeln aufweist

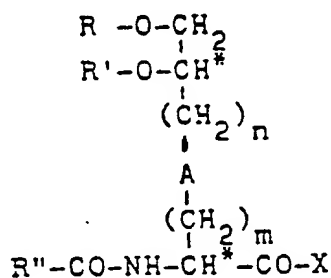
30

35

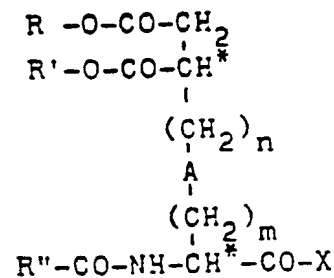
40



I.



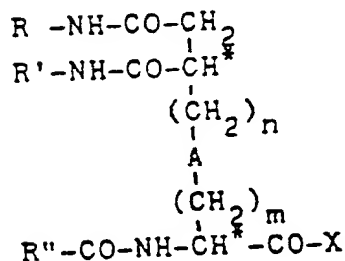
II.



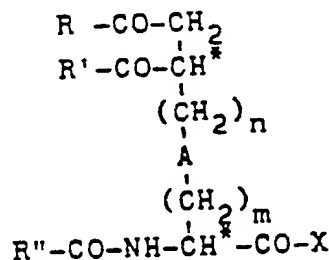
III.

45

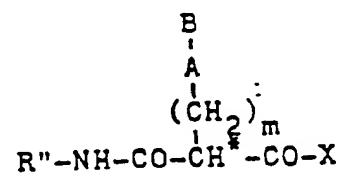
50



IV.

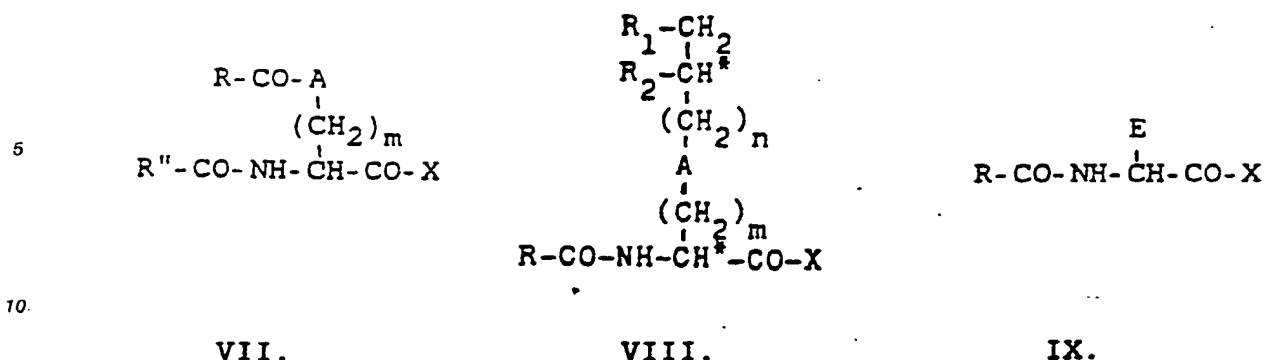


V.



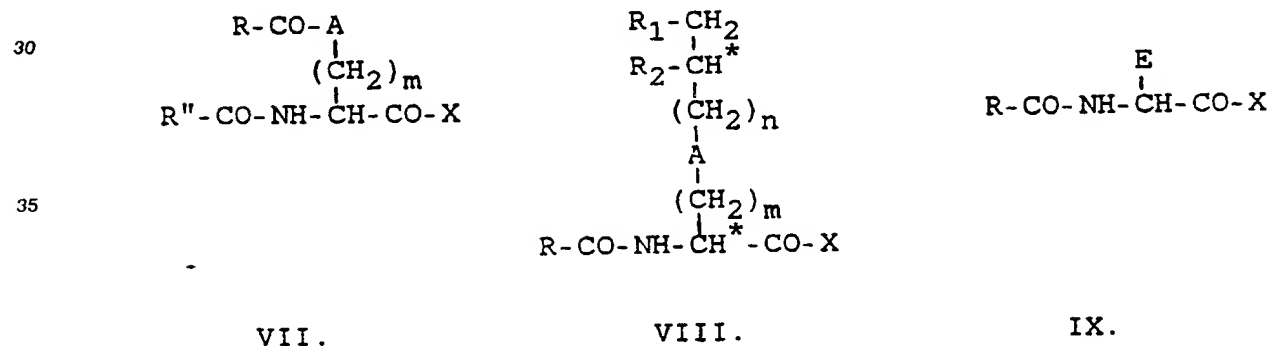
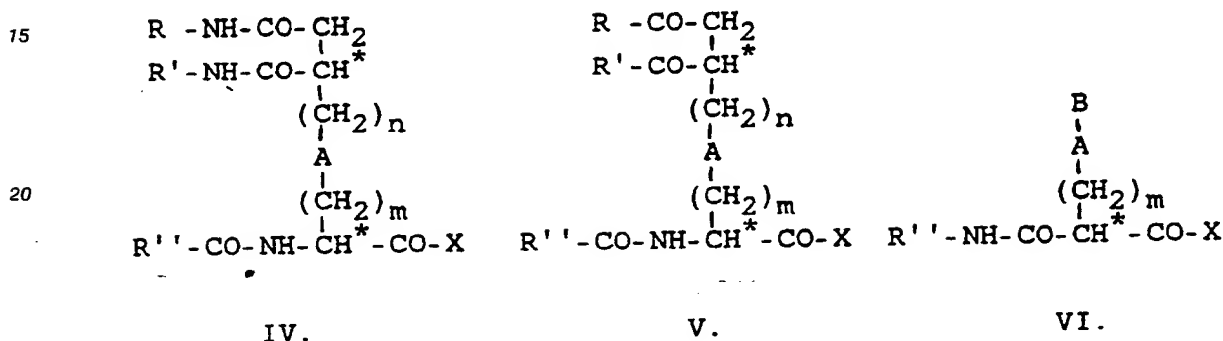
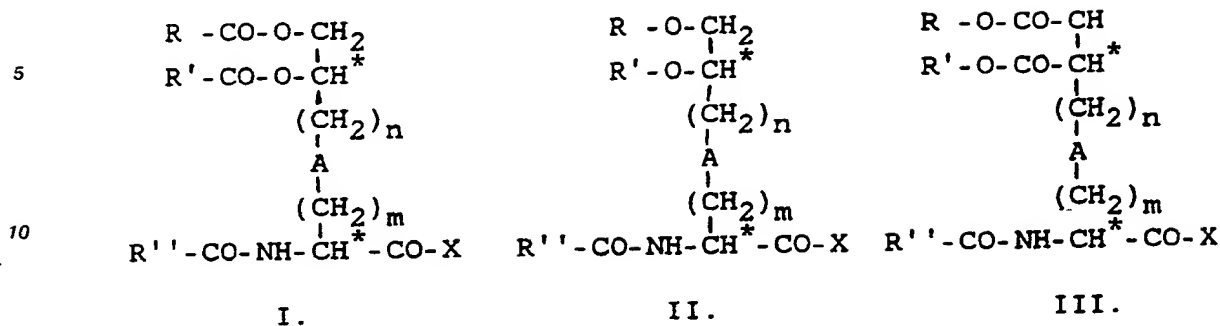
VI.

55



- in denen A Schwefel, Sauerstoff, Disulfid (-S-S-), Methylen (-CH₂-) oder -NH- sein kann;
 n = 0 bis 5, m = 1 oder 2;
 C* ein asymmetrisches Kohlenstoffatom mit R- oder S-Konfiguration ist,
 R, R' und R'' gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine Alkyl-, Alkenyl- oder Alkynylgruppe mit 7 bis 25 Kohlenstoffatomen sind, welche mit Hydroxy-, Amino-, Oxo-, Acyl-, Alkyl- oder Cycloalkylgruppen substituiert sein kann, E in Formel IX Wasserstoff oder eine beliebige Seitenkette einer natürlichen oder
 20 artifiziellen Aminosäure sein kann, B in Formel VI die Bedeutung jedes der in den Formeln I - V aufgeführten -(CH₂)_n-(substituiertes Alkyl)-Reste haben kann und R₁ und R₂ gleich oder verschieden sind und dieselben Bedeutungen wie R, R' und R'' haben, aber auch -OR, -O-COR, -COOR, -NHCOR oder -CONHR sein können, wobei X eine Kette von bis zu 10 Aminosäuren ist, an die das Protein oder die
 25 Partialsequenz des Virus-, Bakterium- oder Parasiten-Proteins oder eines Tumorentigens gebunden ist, oder das Protein oder die Partialsequenz selbst ist.
4. Synthetische Vakzine gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranankerverbindung N-Palmitoyl-S- 2,3-(bispalmitoyloxy)-propyl cysteinyl-seryl-serin ist, wobei die Partialsequenz an den terminalen Serinrest gebunden ist.
- 30 5. Synthetische Vakzine gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein oder die Partialsequenz von einem Adenovirus, HIV, Influenza-Virus, LCMV, MCMV, Hepatitis-Virus, HTLV, FELV, Treponema pallidum, Gonokokkus, Bordetella pertussis oder Plasmodium spec. oder einem anderen ein Killer-T-Zell-Epitop enthaltenden Pathogen stammt.
6. Synthetische Vakzine gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, das ein Gemisch aus Membranankerwirkstoffkonjugaten mit verschiedenen Partialsequenzen vorliegt.
- 35 7. Synthetische Vakzine gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, das neben Membranankerwirkstoffkonjugaten zur Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten auch Membranankerwirkstoffkonjugate zur Erzeugung neutralisierender Antikörper vorhanden sind.
8. Verfahren zur Herstellung einer synthetischen Vakzine gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 7, dadurch gekennzeichnet, daß ein Membranankerwirkstoffkonjugat nach bekannten Methoden synthetisiert wird.
- 40 9. Pharmazeutische oder veterinärmedizinische Zubereitung zur Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten, gekennzeichnet durch einen Gehalt an einer synthetischen Vakzine gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 7, gegebenenfalls neben üblichen Hilfs- und/oder Trägerstoffen und gegebenenfalls neben weiteren Vakzinen.
- 45 10. Verfahren zur Immunisierung von Menschen oder Säugetieren, dadurch gekennzeichnet, das eine Vakzine gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 7 oder eine pharmazeutische oder veterinärmedizinische Zubereitung gemäß Anspruch 9 verabreicht wird.
- Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten: ES, GR:
- 50 1. Verfahren zum Herstellen einer synthetischen Vakzine zur spezifischen Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten, die aus einem Konjugat aus mindestens einer Membranankerverbindung und einem mindestens ein Killer-T-Zellepitop enthaltenden Protein eines Virus, eines Bakteriums, eines Parasiten oder eines Tumorentigens oder mindestens einer mindestens ein Killer-T-Zellepitop enthaltenden Partialsequenz eines Virus-, Bakterium- oder Parasiten-Proteins oder eines Tumorentigens besteht, dadurch gekennzeichnet, daß
 55 ein Membranankerwirkstoffkonjugat nach bekannten Methoden synthetisiert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranankerverbindung ein bakterielles Membran-Lipoprotein ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranankerverbindung eine der

nachstehenden Formeln aufweist



in denen A Schwefel, Sauerstoff, Disulfid (-S-S-), Methylen (-CH₂-) oder -NH- sein kann;

n = 0 bis 5, m = 1 oder 2;

C* ein asymmetrisches Kohlenstoffatom mit R- oder S-Konfiguration ist,

R, R' und R'' gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine Alkyl-, Alkenyl- oder Alkynylgruppe mit 7 bis 25 Kohlenstoffatomen sind, welche mit Hydroxy-, Amino-, Oxo-, Acyl-, Alkyl- oder Cycloalkylgruppen substituiert sein kann, E in Formel IX Wasserstoff oder eine beliebige Seitenkette einer natürlichen oder

artifizellen Aminosäure sein kann, B in Formel VI die Bedeutung jedes der in den Formeln I - V aufgeführten -(CH₂)_n-(substituiertes Alkyl)-Reste haben kann und R₁ und R₂ gleich oder verschieden sind und dieselben Bedeutungen wie R, R' und R'' haben, aber auch -OR, -O-COR, -COOR, -NHCOR oder -CONHR sein können, wobei X eine Kette von bis zu 10 Aminosäuren ist, an die das Protein oder die

Partialsequenz des Virus-, Bakterium- oder Parasiten-Proteins oder eines Tumorantigens gebunden ist, oder das Protein oder die Partialsequenz selbst ist.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranankerverbindung N-Palmitoyl-S-2,3-(bispalmitoyloxy)-propyl - cysteinyl-seryl-serin ist, wobei die Partialsequenz an den terminalen Serinrest gebunden ist.

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein oder die Partialsequenz von einem Adenovirus, HIV, Influenza-Virus, LCMV, MCMV, Hepatitis-Virus, HTLV, FELV, Treponema pallidum, Gono-

kokkus, Bordetella pertussis oder Plasmodium spec. oder einem anderen ein Killer-T-Zell-Epitop enthaltenden Pathogen stammt.

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Gemisch aus Membranankerwirkstoffkonjugaten mit verschiedenen Partialsequenzen hergestellt wird.

5 7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Vakzine hergestellt wird, in der neben Membranankerwirkstoffkonjugaten zur Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten auch Membranankerwirkstoffkonjugate zur Erzeugung neutralisierender Antikörper vorhanden sind.

10

15

20

25

30

35

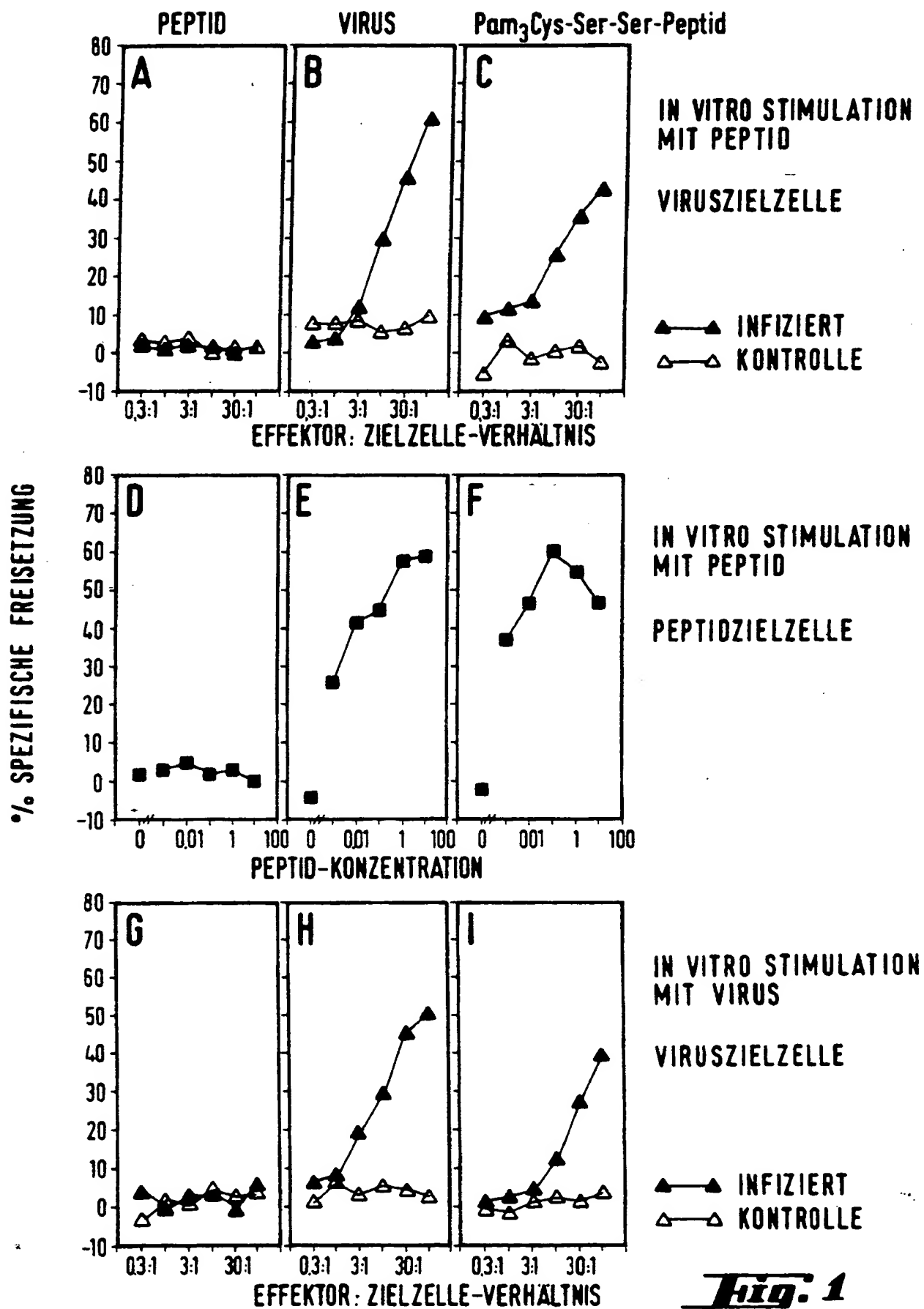
40

45

50

55

IN VIVO IMMUNISIERUNG MIT

**Fig. 1**

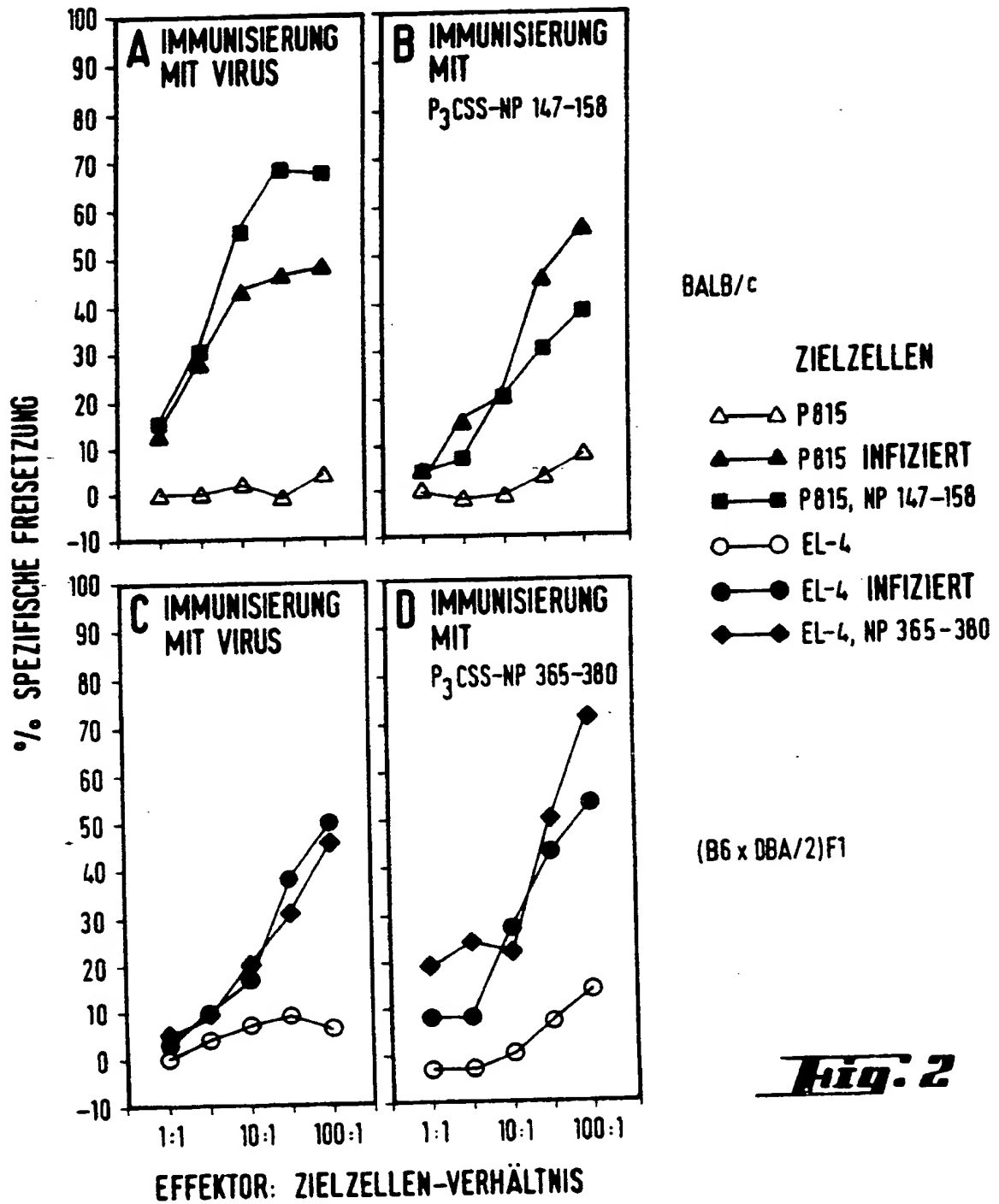


Fig. 2

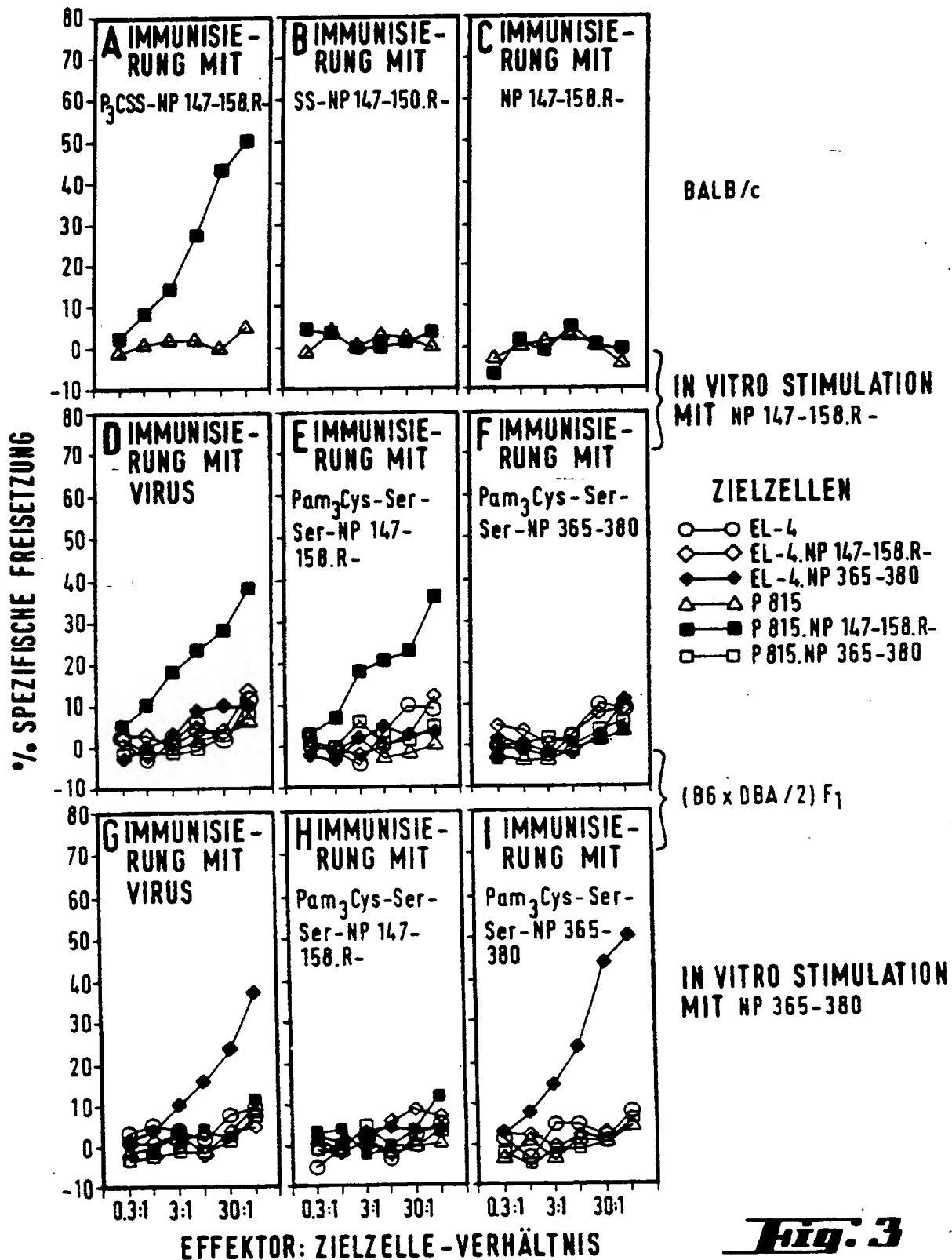


Fig. 3



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT,
der nach Regel 45 des Europäischen Patent-
übereinkommens für das weitere Verfahren als
europäischer Recherchenbericht gilt

Nummer der Anmeldung

EP 90 12 1189

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.4)
X,D	EP-A-0 210 412 (HOECHST AG.) * Insgesamt; besonderes Seite 7, Zeilen 5-23; Ansprüche *	1-9	A 61 K 39/145 A 61 K 39/385
Y	--	1-9	
Y	WO-A-89 02 277 (BOARD OF REGENTS, UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) * Insgesamt; besonderes Seite 9, Zeilen 14-19 und Seite 24, Zeilen 27-30 *	1-9	
	--		
X,P	NATURE, Band 342, 30. November 1989, Seiten 561-564; K. DERES et al.: "In vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with synthetic lipopeptide vaccine" ./.		
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.4)
			A 61 K C 07 K
UNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE			
<p>Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung den Vorschriften des Europäischen Patentübereinkommens so wenig, daß es nicht möglich ist, auf der Grundlage einiger Patentansprüche sinnvolle Ermittlungen über den Stand der Technik durchzuführen:</p> <p>Vollständig recherchierte Patentansprüche: 1-9 Unvollständig recherchierte Patentansprüche: 10 Nicht recherchierte Patentansprüche: 10 Grund für die Beschränkung der Recherche:</p> <p>Verfahren zur chirurgischen oder therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers (Siehe Art. 52(4) des Europäischen Patentübereinkommens)</p>			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 25-02-1991	Prüfer FERNANDEZ BRANAS
<p>KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN</p> <p>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</p> <p>E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>			



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 90 12 1189

-2-

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	betrifft Anspruch	
A	* Der ganze Artikel *	1-9	
	--		
A	EP-A-0 338 437 (HOECHST AG.)		
	* Insgesamt *	1-9	
A	--		
	EP-A-0 203 676 (THE WISTAR INSTITUTE OF ANATOMY AND BIOLOGY)		
A	* Insgesamt *	1-9	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 4)
	--		
A	WO-A-89 07 448 (REGENTS OF THE UNIVERSITY)		
	* Insgesamt *	1-9	
A	--		
	EP-A-0 000 300 (CIBA-GEIGY AG)		
A	* Insgesamt *	1-9	
	--		
A	THE EMBO JOURNAL, Band 7, Nr. 1, 1988, Seiten 93-100, IRL Press Ltd, Oxford, GB; J.B. ROTHBARD et al.: "A sequence pattern common to T cell epitopes"		
	* Der ganze Artikel *	1-9	
A	--		
	CELL, Band 52; 1988, 29. Januari 1988, Seiten 253-258, Cell Press; H.C. BODMER et al.: "Enhanced recognition of a modified peptide antigen by cytotoxic T cells specific for influenza nucleoprotein"		
A	* Der ganze Artikel *	1-9	
